

IDS copy

L1 ANSWER 95 OF 101 JAPIO COPYRIGHT 2000 JPO  
ACCESSION NUMBER: 1993-068574 JAPIO  
TITLE: HYBRID PLASMID  
INVENTOR: EBINUMA HIROYASU; ABIKO HIROYOSHI; OSHIMA  
KIHACHIRO;  
PATENT ASSIGNEE(S): HATA KUNIO; SANO HIROSHI  
JUJO PAPER CO LTD, JP (CO 359170)  
AKITA PREF GOV, JP (GO)  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC
JP 05068574	A	19930323	Heisei	(5) C12N015-82

JP

APPLICATION INFORMATION

ST19N FORMAT: JP1991-119015 19910424  
ORIGINAL: JP03119015 Heisei  
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Unexamined  
Applications,  
Section: C, Sect. No. 1086, Vol. 17, No. 388, P. 9

tryptophan monooxygenase, from *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. PCR primers (see T37905 and T37906) were used for amplifying the *iaaM* region

L12 ANSWER 33 OF 34 PAPERCHEM2 COPYRIGHT 2000 IPST

AB An antisense DNA method was investigated to improve crown gall disease resistance in the elite aspen (*Populus*) clone Kitakami Hakuyou, which is

a commercial hybrid produced by Nippon Paper Industries from female *P. sieboldii* (Japanese aspen) and an elite male *P. grandidentata* (bigtooth aspen). Crown gall disease induction, formation, and resistance were

first

studied in tobacco using *Agrobacterium tumefaciens* and a binary vector system based on the plasmid pBI121m, which included the HindIII fragment 41 of the *iaaM* gene in sense or antisense orientation.

No clear correlation between transcriptional activity and disease resistance was detected. An improved, highly efficient transformation procedure was developed from other tobacco work and was applied in the aspen clones through the induction and growth of transgenic callus from infected stem segments and shoot regeneration from the callus. In about 10% of the transgenic plants, crown gall disease symptoms were inhibited, although considerable variability in gall development was apparent.

L12 ANSWER 34 OF 34 PAPERCHEM2 COPYRIGHT 2000 IPST

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-68574

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/82				
A 01 H 1/00	A 8502-2B			
5/00	A 8502-2B			
	8828-4B	C 12 N 15/00	A	
	7236-4B	5/00	C	
		審査請求 有	請求項の数 3 (全 4 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-119015

(22)出願日 平成3年(1991)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成2年11月10日  
日本分子生物学会発行の「第13回日本分子生物学会年会  
プログラム・講演要旨集」に発表

(71)出願人 000183484  
十條製紙株式会社  
東京都北区王子1丁目4番1号  
(71)出願人 591108178  
秋田県  
秋田県秋田市山王4丁目1番1号  
(72)発明者 海老沼 宏安  
東京都北区王子5丁目21番1号 十條製紙  
株式会社中央研究所内  
(72)発明者 我彦 広悦  
秋田県南秋田郡大潟村南2-2 秋田県立  
農業短期大学 生物工学研究所内  
(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ハイブリッドプラスミド

(57)【要約】

【構成】アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT1プラスミド由来のオーキシン合成酵素をコードする遺伝子<sup>laam</sup>の二つの<sup>B</sup>ind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を植物のバイナリープラスミドに組み込んだハイブリッドプラスミド並びに該ハイブリッドプラスミドにより形質転換され、クラウンゴール病抵抗性を有する植物体。

【効果】本発明のハイブリッドプラスミドは、クラウンゴール病抵抗性を植物に付与することができる。したがって、このハイブリッドプラスミドを植物体に導入することにより、クラウンゴール病抵抗性品種を容易に作成することが可能である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アグロバクテリウム・ツメファシェンスのT<sub>1</sub>プラスミド由来のオーキシン合成酵素をコードする遺伝子iaaMの二つのHind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を植物のバイナリーベクタープラスミドに組み込んだハイブリッドプラスミド。

【請求項2】 オーキシン合成酵素をコードする遺伝子iaaMの二つのHind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片が、アグロバクテリウム・ツメファシェンスPO 22系統のT<sub>1</sub>プラスミド由来のものであり、植物のバイナリーベクタープラスミドpBI 121である請求項1記載のハイブリッドプラスミド。

【請求項3】 請求項1記載のハイブリッドプラスミドにより形質転換され、クラウンゴール病抵抗性を有する植物体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ハイブリッドプラスミドに関し、詳しくはクラウンゴール病抵抗性を植物に付与するハイブリッドプラスミドに関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 植物病原菌アグロバクテリウム・ツメファシェンスは、難防除病害であるクラウンゴール病を多くの植物に引き起こすことが知られている。このクラウンゴール病は、植物の根、幹などにこぶ状のがん腫を形成する病気であり、樹木、果樹などの永年性の作物に対して特に被害が大きく、成長の阻害や収量の減少を引き起こしている。また、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリアなどでは、種苗生産時の罹病が問題となっている。

【0003】 この植物のがん腫は、アグロバクテリウム・ツメファシェンスのT<sub>1</sub>プラスミドのT領域上に存在する発がん遺伝子が植物細胞に導入されて発現し、細胞の異常増殖が生じることによる。発がん遺伝子は、植物ホルモンであるオーキシンを合成する酵素をコードしている遺伝子iaaMとiaaH及びサイトカイニンを合成する酵素をコードしている遺伝子iptよりなり、がん腫細胞において植物ホルモンの過剰生産を引き起こしている。

【0004】 非病原性のアグロバクテリウムの一系統であるアグロバクテリウム・ラジオバクターK 84は、病原性の系統に致死的な毒性のある抗生物質アグロシン84を分泌する。そこで、これをを利用して病原性アグロバクテリウム・ツメファシェンスの生物的防除が試みられているが、この方法はすべての病原性系統が必ずしもアグロシン84に感受性ではないので、適用範囲が限定され、未だ十分に実用化されるには至っていない。したがって、より効果的で普遍的な手法の開発が望まれている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 植物にクラウンゴール病

2

抵抗性を付与するため、遺伝子組み換えの手法により耐病性遺伝子を作成し、これを植物体に導入した。

【0006】 すなわち、本発明はアグロバクテリウム・ツメファシェンスのT<sub>1</sub>プラスミド由来のオーキシン合成酵素をコードする遺伝子iaaMの二つのHind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を植物のバイナリーベクタープラスミドに組み込んだハイブリッドプラスミド並びに該ハイブリッドプラスミドにより形質転換され、クラウンゴール病抵抗性を有する植物体に関する。

【0007】 耐病性遺伝子は、クラウンゴール病の病原菌であるアグロバクテリウム・ツメファシェンスが植物細胞に導入する発がん遺伝子の発現を抑えることにより、耐病性を植物に付与するものである。発がん遺伝子の発現抑制は、植物ホルモンであるオーキシンの合成に関与している発がん遺伝子の一つであるオーキシン合成酵素遺伝子iaaMのDNA断片をアンチセンスまたはセンス方向に有する耐病性遺伝子と、アグロバクテリウム・ツメファシェンスにより植物に遺伝子導入される発がん遺伝子との干渉効果によるものである。

【0008】 耐病性遺伝子は、下記の如くして作成された本発明のハイブリッドプラスミドにより植物体に導入される。

【0009】 ヤマナラシのがん腫より分離されたアグロバクテリウム・ツメファシェンスのPO 22系統からT<sub>1</sub>プラスミドDNAを抽出し、これを制限酵素Pst Iで切断してオーキシン合成酵素遺伝子iaaMが存在するDNA断片をpUC13プラスミドにクローニングする。遺伝子iaaMは、開始コドンから143bpと840bp下流にHind III部位を有している (J. Gielen et al, The EMBO Journal, vol. 3, 835~846, 1984)。この二つのHind II切断部位に挟まれた断片は、T 37 T-DNAをHind IIIで切断したDNA断片の41番目に相当する (M. W. Bevan et al, Ann. Rev. Genet., vol. 16, 357~384, 1982)。該Hind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を取り出し、Klenowフラグメントを用いて末端を平滑にした後、pUC19プラスミドのSma I部位に再度クローニングする。

【0010】 このプラスミドに挿入したDNA断片の塩基配列をダイデオキシ法により決定し、遺伝子iaaMのDNA断片がpUC19プラスミドに対し向きの異なる二つのクローニングする。

【0011】 一方、植物のバイナリーベクタープラスミドpBI 121は、植物細胞内で発現可能なカナマイシン耐性遺伝子(NPT II)を有する。pUC19プラスミドより前記のHind III断片を含むBamH I-Sac I断片を取り出し、該プラスミドpBI 121のBamH I/Sac I部位に挿入してハイブリッドプラスミドを得る。

【0012】 このハイブリッドプラスミドは、カリフラワーキノイクウイルスの35SプロモーターとT<sub>1</sub>プラスミドのパリン合成酵素遺伝子のポリA認識シグナル

の間に遺伝子 $iaaM$ のDNA断片を、本来の遺伝子 $iaaM$ と同じ向き（センス）または逆向き（アンチセンス）に有している。

【0013】上記の耐病性遺伝子を含むハイブリッドプラスミドを用い、常法により形質転換することによりクラウンゴール病抵抗性を有する植物体が得られる。

【0014】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

#### 実施例1

ヤマナラシのがん腫より分離したアグロバクテリウム・ツメファシェンスのP022系統からT1プラスミドDNAを抽出した。次いで、これを制限酵素 $PstI$ で切断してオーキシン合成酵素遺伝子 $iaaM$ が存在するDNA断片をpUC13プラスミドにクローニングした。この遺伝子 $iaaM$ の $HindIII$ 切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を取り出し、Klenowフラグメントを用いて末端を平滑にした後、pUC19プラスミドの $SmaI$ 部位に再度クローニングした。

【0015】pUC19プラスミドに挿入したDNA断片の塩基配列をダイデオキシ法により決定し、遺伝子 $iaaM$ のDNA断片が該pUC19プラスミドに対し向きの異なる二つのクローニングを得た。

【0016】次に、上記pUC19プラスミドより前記の $HindIII$ 断片を含む $BamH I-Sac I$ 断片を取り出し、これを植物細胞内で発現可能なカナマイシン耐性遺伝子（NPT II）を有するバイナリーベクタープラスミドpBI121の $BamH I/Sac I$ 部位に挿入してハイブリッドプラスミドを得た。

【0017】実施例2

実施例1で得たハイブリッドプラスミドを凍結融解法により、アグロバクテリウム・ツメファシェンスのLBA4404系統に導入し、タバコのリーフディスク（葉片）にアグロバクテリウム・ツメファシェンスを感染させた。次いで、これをカナマイシンとホルモンを含むMurashige-Skoog培地に置いて培養し、芽に分化してきたカナマイシン耐性遺伝子を有する組み換え個体を選抜した。

【0018】遺伝子 $iaaM$ のDNA断片をアンチセンスとセンス方向に有するタバコ組み換え個体を刷化し、人工

気象器で栽培した。アグロバクテリウム・ツメファシェンスP22R1系統を、正常個体と組み換え個体の各リーフディスクに感染させ、上記Murashige-Skoog培地に置床した。その結果、根頭がん腫病に感染性である正常個体のリーフディスクには、がん腫の形成が観察された。

【0019】一方、遺伝子 $iaaM$ のDNA断片をセンス方向に有するタバコ組み換え個体（SCR）は、顕著にがん腫形成を阻止し、クラウンゴール病抵抗性を有することが確認された。また、遺伝子 $iaaM$ のDNA断片をアンチセンス方向に有するタバコ組み換え個体（ACR）には、がん腫の形成のほか多芽体を生ずる異常がん腫が観察された。

【0020】タバコ組み換え個体のSouthern解析により、上記SCR個体には、4コピーの遺伝子 $iaaM$ のDNA断片がセンス方向に組み込まれており、ACR個体には、1コピーの遺伝子 $iaaM$ のDNA断片がアンチセンス方向に組み込まれていることが確認された。さらに、Northern分析により、両方向のDNAは共に転写されていることが判明した。

【0021】次に、植物体でのクラウンゴール病抵抗性を検定するために、15cmの高さのタバコ組み換え個体の茎に注射針で穴をあけ、アグロバクテリウム・ツメファシェンスP22R1を接種した。その結果、正常個体の場合は、ほとんどすべての接種部位に根頭がん腫病の特徴であるがん腫の形成が認められた。一方、SCR個体の場合は、がん腫の形成がほとんど認められず、接種部位の一部で芽が形成された。また、ACR個体の場合は、約半数にがん腫の形成が認められるが、数も少な

い上に大きさにもバラツキが観察された。なお、SCR個体およびACR個体は、他の日本産アグロバクテリウム・ツメファシェンス系統にもほぼ完全な根頭がん腫病抵抗性を示した。

【0022】

【発明の効果】本発明により得られたハイブリッドプラスミドは、クラウンゴール病抵抗性を植物に付与することができる。したがって、このハイブリッドプラスミドを植物体に導入することにより、クラウンゴール病抵抗性品種を容易に作成することが可能である。

#### 【手続補正書】

【提出日】平成4年9月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】ヤマナラシのがん腫より分離されたアグロバクテリウム・ツメファシェンスのP022系統からT

1プラスミドDNAを抽出し、これを制限酵素 $PstI$ で切断してオーキシン合成酵素遺伝子 $iaaM$ が存在するDNA断片をpUC13プラスミドにクローニングする。遺伝子 $iaaM$ は、開始コドンから143bpと840bp下流に $HindIII$ 部位を有している (J. Gielen et al, The EMBO Journal, vol. 3, 835~846, 1984)。この二つの $HindII$ 切断部位に挟まれた断片は、T37 T-DNAを $HindIII$ で切断したDNA断片の41番目に相当する (M.

W. Bevan et al, Ann. Rev. Genet., vol. 16, 357~384, 1982)。該 Hind III切断部位に挟まれた部分を含むDNA断片を取り出し、Klenowフラグメントを用いて末端を平

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
// C 1 2 N	5/10			
	15/52			
(C 1 2 N	15/52			
C 1 2 R	1:01)			

(72)発明者 大島 喜八郎  
東京都北区王子5丁目21番1号 十條製紙  
株式会社中央研究所内

(72)発明者 秦 邦男  
東京都北区王子5丁目21番1号 十條製紙  
株式会社中央研究所内  
(72)発明者 佐野 浩  
秋田県南秋田郡大潟村南2-2 秋田県立  
農業短期大学 生物工学研究所内